中国吊钟花属植物核 DNA 含量（2C-值）与倍性水平研究

梁华[1,4], 蒋露[1,4], 朱大海[2], 周建伟[3*], 范邓妹[4], 张志勇[4]
（1. 江西农业大学 林学院，南昌 330045；2. 龙溪-虹口国家级自然保护区，成都 611830；3. 江西农业大学 科技园，南昌 330045；4. 江西农业大学 亚热带生物多样性实验室，南昌 330045）

摘要：植物核 DNA 含量（2C-值）与倍性水平是重要的植物学基本特征，是进行种群进化、物种分类和生态学等研究的有力证据。为确定中国吊钟花属（*Enkianthus* Lour.）各物种的核 DNA 含量与倍性水平，并探究该属植物在种间、种内核 DNA 含量差异，该研究以 6 种中国吊钟花属植物共 23 个居群 60 个样品为试验材料，以水稻品种'日本晴'（*Oryza sativa* L. spp. *japonica* 'Nipponbare'）为内部参照，利用流式细胞术检测该属植物核 DNA 含量。进而以二倍体植物齿缘吊钟花（*Enkianthus serrulatus*）为倍性参照推测其它种的染色体倍性，并采用染色体压片计数法验证倍性的准确性。结果显示：（1）该属植物核 DNA 含量介于 1.77–5.62 pg 之间。（2）吊钟花组 4 个种：吊钟花（*E. quinqueflorus*）、齿缘吊钟花、晚花吊钟花（*E. serotinus*）、台湾吊钟花（*E. perulatus*）均为二倍体（2n=2x=22）；总状花序组 2 个种：灯笼树（*E. chinensis*）和毛叶吊钟花（*E. deflexus*）均存在四倍体和六倍体。（3）该属二倍体植物核 DNA 含量在种间、种内存在显著性差异（P<0.05），四倍体和六倍体植物在种间、种内没有显著性差异（P>0.05）。该研究为吊钟花属系统发育、生物地理、引种驯化、遗传育种等研究奠定了基础。

关键词：吊钟花属，多倍体，基因组大小，流式细胞术，染色体压片

中图分类号：Q943　　**文献标识码：**A　　文章编号：

Nuclear DNA content (2C-value) and ploidy level of *Enkianthus* species (Ericaceae) from China

LIANG Hua[1,4], JIANG Lu[1,4], ZHU Dahai[2], ZHOU Jianwei[3*], FAN Dengmei[4], ZHANG Zhiyong[4]

（1. *College of Forestry*, *Jiangxi Agricultural University*, Nanchang 330045, China; 2. *Longxi-Hongkou National Natural Reserve*, Chengdu 611830, China; 3. *Science and Technology Park*, *Jiangxi Agricultural University*, Nanchang 330045, China; 4. *Laboratory of Subtropical Biodiversity*, *Jiangxi Agricultural University*, Nanchang 330045, China）

Abstract： The plant nuclear DNA content (2C-value) and ploidy level are important botanical characteristics which are powerful evidences for studies on population evolution, biosystematics and ecology. In order to determine the nuclear DNA content and ploidy level of *Enkianthus* Lour. from China, and to explore the difference of nuclear DNA content between interspecies and

基金项目：国家自然科学基金（No. 31660059, No. 31960049）[Supported by the National Natural Science Foundation of China（No. 31660059, No. 31960049）]。
作者简介：梁华（1996-），硕士研究生，主要从事植物系统与进化研究，（E-mail）hualiang1556@126.com。
* **通讯作者：**周建伟，讲师，主要从事林木花卉遗传育种研究，（E-mail）zhoujianwei@jxau.edu.cn。

intraspecies. Here, we collected 60 samples from 23 populations as experimental materials, representing all six species of *Enkianthus* in subtropical areas of China. We used *Oryza sativa* L. spp. *japonica* variety 'Nipponbare' as an internal standard to determine their nuclear DNA Content by flow cytometry, and then the ploidy level was examined by referencing the 2C-value of a diploid species of *E. serrulatus*. In addition, the ploidy level was further verified by using traditional chromosome tableting technology. The results were as follows: (1) The mean nuclear DNA content of *Enkianthus* species in China ranged from 1.77 pg to 5.62 pg. (2) Four species in *E.* Sect. *Enkianthus*: *E. quinqueflorus*, *E. serrulatus*, *E. serotinus* and *E. perulatus* were diploid (2n=2x=22), and two species in *E.* Sect. *Racemus*: *E. chinensis* and *E. deflexus* were tetraploid or hexaploid. (3) For diploid species, the nuclear DNA content showed significant differences between interspecies and intraspecies ($P<0.05$), but there were no significant difference in tetraploid and hexaploid species ($P>0.05$). The results of this study will lay a certain foundation for the future researches on phylogenetics, biogeography, domestication and genetic breeding of *Enkianthus*.

Key words：*Enkianthus*, polyploid, genome size, flow cytometry, chromosome tableting

DNA 携带着生物体的遗传信息，是生物体生存与繁衍的核心。DNA 含量与生物体的细胞大小、代谢速率、叶片气孔密度等都呈一定的相关性（Beaulieu et al., 2007, 2008）。每个生物体的 DNA 含量常常是恒定的，为了更加形象的描述生物体的 DNA 含量，Swift（1950）提出“C-值”（C-value）一词，特指生物配子体（染色体数目为 n）细胞核中的 DNA 含量。C-值的变化表现的是植物基因组大小多样性，目前，植物 DNA C-值数据库（https://cvalues.science.kew.org/）收集了被子植物、裸子植物、蕨类、苔藓和藻类共计 12 273 种植物的 C-值数据。由于细胞有丝分裂间期拥有两套未复制基因组，故细胞核中具有 2C DNA 含量（2C-值）（Dolezel & Bartoš, 2005）。2C-值是描述生物多样性的一个主要特征参量，在分子生物学、生物系统学、生态学和种群生物学等领域都具有重要意义（Bennett et al., 2000; 倪丽萍和郭水良，2005；Kron et al., 2007）。

核 DNA 含量的测定方法主要有化学分析法（chemical analysis）（Schmidt & Thannhauser, 1945）、复性动力学法（reassociation kinetics）（Britten & Kohne, 1968）、孚尔根显微分光光度测定法（Feulgen microspectrophotometry）（Feulgen & Rossenbeck, 1924; Deeley, 1955）、DNA 图像光密度法（DNA image densitometry）（Vilhar et al., 2001）和流式细胞术（flow cytometry）（Galbraith et al., 1983）。其中，流式细胞术因其操作简单、检测高效、结果精准等优势，已成为核 DNA 含量测定的主流方法（Bennett & Leitch, 2011）。此外，对于估算染色体小、数目多，以及难以获取染色体压片材料的植物的倍性，流式细胞术有着广大应用前景（Bailey et al., 2008）。

吊钟花属（*Enkianthus* Lour.）是杜鹃花科（Ericaceae）中的一个东亚特有小属，约12种。我国吊钟花属植物种类较为丰富，共7种（Fang & Steven, 2005），分别是单花吊钟花（*E. pauciflorus*）吊钟花（*E. quinqueflorus*）、齿缘吊钟花（*E. serrulatus*）、晚花吊钟花（*E. serotinus* ）、台湾吊钟花（*E. perulatus* ）、灯笼树（*E. chinensis*）和毛叶吊钟花（*E. deflexus*）。吊钟花属植物小巧玲珑的钟形花朵惹人怜爱，尤其是吊钟花更是花中珍品，在广州花市上享有盛誉（徐廷志, 1982）。吊钟花属植物拥有较大的倍性变化，1960年，Sax（1960）报道了日本吊钟花属植物存在二倍体（2n=22）和八倍体（2n=88）。但因其染色体较小，细胞学观察较难，关于该属的倍性研究一直没有较大进展。另外，吊钟花属植物还具有抗炎等药用价值

（Wang et al., 2020）。吊钟花属植物具有较高的研究价值，目前该属的相关研究多局限于分类与系统发育（徐廷志，1982；Anderberg, 1994; Tsutsumi & Hirayama, 2012）、栽培繁育（杨建芬等，2009；潘文等，2010；李超等，2020）、化学成分（Ogawa et al., 1970; Sakakibara et al.,1983; Wang et al., 2014）等方面。而吊钟花属核DNA含量与倍性水平的基础性研究却严重缺失，已经阻碍了该类群系统发育，植物资源利用和遗传育种等相关领域的研究。

针对中国吊钟花属植物总共有几种倍性？同一物种是否存在多种倍性？相同倍性的物种核DNA含量是否存在差异？同一物种在不同分布区其核DNA含量是否存在差异？等问题。本研究使用流式细胞术检测国内吊钟花属6个物种的核DNA含量与倍性水平，并用传统的压片观察计数染色体数量以验证倍性。而后计算该属植物基因组大小，探讨植物核DNA含量在种间、种内的差异和地理环境的关系，以及该属不同倍性植物之间可能存在的亲缘关系。本研究可以填补中国吊钟花属植物核DNA含量与倍性研究的空白，以期为吊钟花属植物资源利用、多倍化、系统发育、引种驯化、遗传育种和基因组学等方面研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

野外采集来自中国 10 个省(自治区)27 个县的吊钟花属植物的活体植株和/或种子材料，其中活体植株收集了 6 个种 23 个居群 60 株，种子收集了 6 个种 8 个居群（表 1），凭证标本保存于江西农业大学亚热带生物多样性实验室（LSTB-JXAU）。将 6 种吊钟花属植物种子，在恒温 20 ℃人工气候箱内催芽，取其幼嫩根尖用于染色体压片试验。活体植株则移栽于江西农业大学生态园中，其幼嫩叶片用于流式细胞术检测。根据前人研究（Dolezel et al., 2007），本文选用水稻品种‘日本晴’（*Oryza sativa* L. spp. *japonica* ‘Nipponbare’）（Sasaki & Burr, 2000）作为 2C-值的标准参照。水稻催芽后栽培于人工气候培养箱中，待其长叶后使用。使用二倍体齿缘吊钟花（*E. serrulatus*）作为倍性参照。

1.2　试验方法

1.2.1　染色体压片计数

待种子露出约 0.5~1 cm 胚根时，取健壮个体 5~8 个，放入 4℃预冷的 2.0 mL 离心管中，并加入 0.6 mL 4 ℃预冷的超纯水，放入冰水混合物中预处理 6 h。预处理材料用超纯水冲洗数次，然后转移至现配卡诺 I 固定液（冰乙酸:无水乙醇=1:3），放入 4 ℃冰箱中固定 4 h。固定材料水洗数次，然后放入提前预热至 60℃的 1mol·L^{-1} 盐酸溶液中，解离 8 min 左右。解离材料水洗数次，取根尖于洁净的载玻片上，取其分生区（距根冠 2~5 mm 之间，颜色为乳白色部分），加 1 滴改良苯酚品红染色液，染色 10 min 后制片。使用奥特光学 BK6000 显微镜检，选择染色体形态清晰、分散性好的细胞，使用 OPTPro 3000 显微图像分析处理软件添加标尺并进行拍摄。最后，选择 30 个以上分裂像较好的中期细胞，统计染色体数目。

1.2.2　流式细胞术检测法

参考（Dolezel et al., 2007）的方法，取 1 cm×1 cm 左右待测叶片组织放入 60 mm 培养皿中，滴加 1 mL WPB 解离液（200 mM Tris; 4 mM $MgCl_2·6H_2O$; 2 mM $Na_2EDTA·2H_2O$; 86 mM NaCl; 10 mM 焦亚硫酸钠; 1% PVP-10; 1% （v/v） Tritonx-100，PH 7.5），使用锋利的刀片垂直运刀，迅速切碎样品，不可沿培养皿底部刮擦刀片，以防细胞核破裂，整个过程，材料须浸没在解离液里，以便更好地游离细胞核（叶林江等, 2015）。后向培养皿中加入 1mL

DAPI 染料（Sysmex 公司），冰上避光孵育 10 min，期间轻轻摇匀 2~3 次，再用 400 目尼龙网过滤，得到染色后的细胞核悬液。使用德国 Sysmex 公司的 CyFlow® Cube 6 流式细胞仪，采用 UVLED 光激发，每个样品以水稻为标准内参，每次检测至少收集 10 000 个细胞，每个样品进行 3 次重复试验，同一居群取所有个体的平均值。

1.3 数据分析

使用软件 FlowJo 7.6 进行流式细胞术试验数据采集和分析，样品平均峰值的变异系数（coefficient ofvariation，CV=标准差/平均值× 100%）大于 5%的结果予以舍弃。样品细胞核 DNA 含量 （2C-值） 计算公式为: 样品 2C-值（DNA pg 或 Mbp）=（样品平均峰值/标样平均峰值）×标样的 2C-值（Dolezl et al., 2007），并根据 1 pg DNA=978 Mb（Dolezl et al., 2003），计算该属植物基因组大小。用二倍体齿缘吊钟花做参照，推测该属其他物种的倍性水平，计算公式为：样品倍性（整数）=（样品 G_1 平均峰值/标样 G_1 平均峰值）×标样倍性（Dolezl et al., 2007）。使用 SPSS 22.0 对核 DNA 含量（2C-值）数据进行显著性统计分析，并使用 OriginPro 9.0 软件绘图。

表 1　吊钟花属试验样品信息

Table 1　Sample information of *Enkianthus* Lour.

物种 Species	居群 Population	采集地点 Locality	样品数(叶片) No. of leaf samples
晚花吊钟花 *Enkianthus serotinus* Chun et Fang	E1	广东乳源 Ruyuan，Guangdong	3
	E2	广东连山* Lianshan，Guangdong*	-
台湾吊钟花 *Enkianthus perulatus* C. K. Schneid.	E3	江西黎川 Lichuan，Jiangxi	3
	E4	江西庐山* Lushan，Jiangxi*	-
吊钟花 *Enkianthus quinqueflorus* Lour.	E5	广东深圳* Shenzhen，Guangdong*	3
	E6	广东博罗 Boluo，Guangdong	2
	E7	广西南宁 Nanning，Guangxi	1
	E8	广东五华 Wuhua，Guangdong	1
	E9	广东丰顺 Fengshun，Guangdong	1
齿缘吊钟花 *Enkianthus serrulatus* (Wils.) Schneid.	E10	江西永修* Yongxiu，Jiangxi*	3
	E11	贵州赤水 Chishui，Guizhou	4
	E12	贵州施秉 Shibing，Guizhou	1
	E13	湖南新宁 Xinning，Hunan	3
	E14	湖北利川 Lichuan，Hubei	3
毛叶吊钟花 *Enkianthus deflexus* (Griff.) Schneid.	E15	西藏林芝 Linzhi，Tibet	3
	E16	四川峨眉山 Emeishan，Sichuan	4
	E17	四川美姑 Meigu，Sichuan	3
	E18	四川洪雅 Hongya，Sichuan	1
	E19	贵州江口* Jiangkou，Guizhou*	-
	E20	四川都江堰* Dujiangyan，Sichuan*	3
灯笼树 *Enkianthus chinensis* Franch.	E21	云南彝良 Yiliang，Yunnan	3
	E22	广西兴安 Xingan，Guangxi	3
	E23	江西武宁* Wuning，Jiangxi*	2
	E24	湖南洪江 Hongjiang，Hunan	3

E25	四川青川 SQingchuan，Sichuan	4
E26	重庆巫山 Wushan，Chongqing	3
E27	湖南桑植* Sangzhi，Hunan*	-

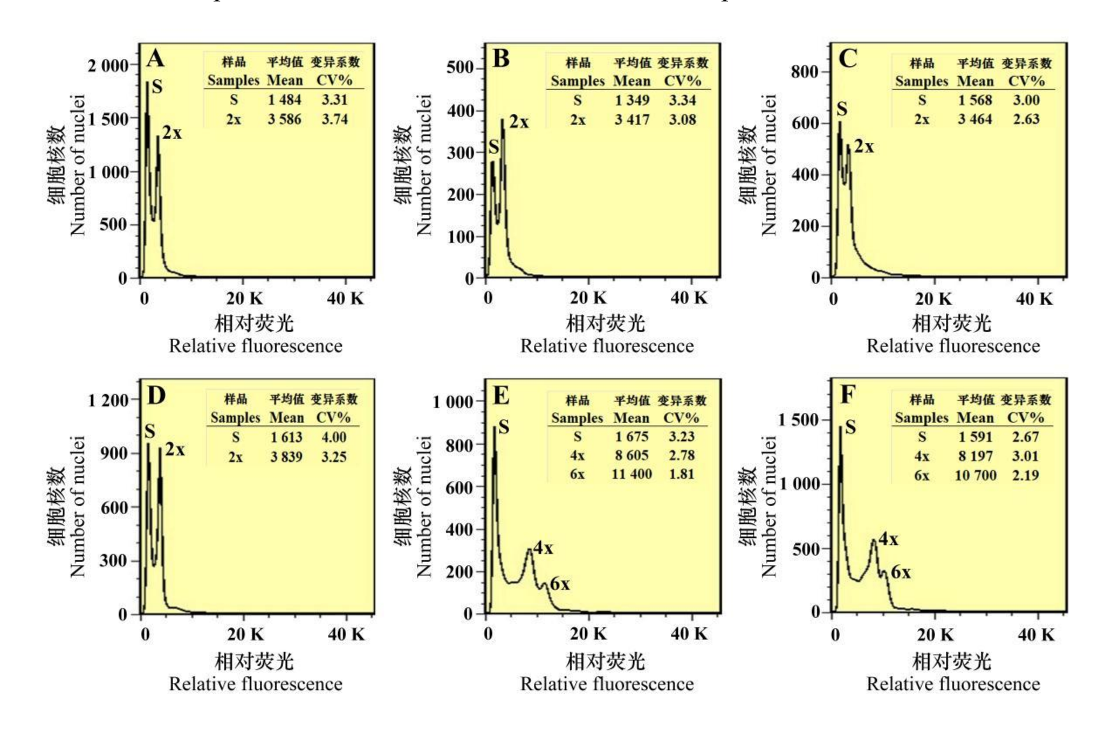
注：* 该居群种子已收集。

Note：* Seeds in this population have been collected.

2 结果与分析

2.1 核 DNA 含量（2C-值）与基因组大小

样品平均峰值的变异系数（CV）均保持在 5%以内（图 1），通过进一步计算，得到了 6 种吊钟花属植物的 2C-值及基因组大小。六倍体毛叶吊钟花核 DNA 含量（2C-值）最大，平均值为 5.62 pg；最小的是吊钟花，平均值为 1.77 pg。六倍体毛叶吊钟花基因组大小最大，平均值为 2 747.02 Mbp；最小的是吊钟花，平均值为 866.19 Mbp（表 2）。



A. 晚花吊钟花；**B.** 台湾吊钟花；**C.** 吊钟花；**D.** 齿缘吊钟花；**E.** 毛叶吊钟花；**F.** 灯笼树。内标：水稻（S）。
A. *E. serotinus*; **B.** *E. perulatus*; **C.** *E. quinqueflorus*; **D.** *E. serrulatus*; **E.** *E. deflexus*; **F.** *E. chinensis*. Internal standard: *Oryza. Sativa* (S).

图 1 吊钟花属植物流式细胞分析图

Fig. 1 Flow cytometry histograms of *Enkianthus* Lour.

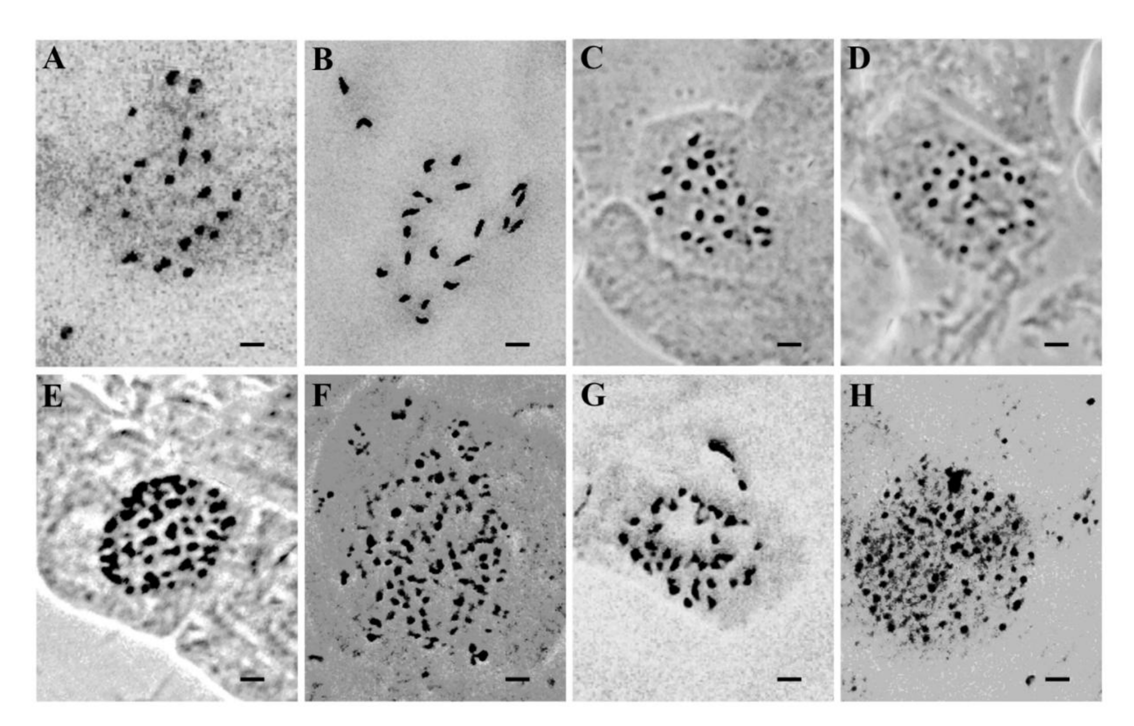
表 2　吊钟花属 6 种植物核 DNA 含量与倍性水平(平均值±标准差)

Table 2　Nuclear DNA content and Ploidy of six species of *Enkianthus* Lour. (means±SD)

物种 Species	居群 Population	居群数 No. of populations	样品数（叶片） No. of leaf samples	染色体数目 2n	倍性 Ploidy	核 DNA 含量 2C-value (pg)	基因组大小 C-value (Mbp)
吊钟花 *E. quinqueflorus*	E5-9	5	8	22	2x	1.77±0.04	866.19±20.91
齿缘吊钟花 *E. serrulatus*	E10-14	5	14	22	2x	1.83±0.04	894.28±21.31
晚花吊钟花 *E. serotinus*	E1-2	1	3	22	2x	1.90±0.01	930.56±4.90
台湾吊钟花 *E. perulatus*	E3-4	1	3	22	2x	2.01±0.01	981.75±3.31
毛叶吊钟花 *E. deflexus*	E15-19	4	11	44	4x	4.02±0.14	1 967.25±70.23
灯笼树 *E. chinensis*	E21-23	3	8	44	4x	4.07±0.12	1 991.56±56.25
灯笼树 *E. chinensis*	E24-27	3	10	66	6x	5.58±0.11	2 729.13±52.65
毛叶吊钟花 *E. deflexus*	E20	1	3	66	6x	5.62±0.08	2 747.02±37.88

2.2　倍性水平的确定

染色体压片结果显示，吊钟花组的齿缘吊钟花、晚花吊钟花、台湾吊钟花、吊钟花的染色体数目为 22 条，均为二倍体，总状花序组的毛叶吊钟花和灯笼树的染色体数目为 44 和 66 条，均存在四倍体与六倍体（图 2），流式细胞术检测的倍性结果与之一致（表 2）。



A 晚花吊钟花；**B** 台湾吊钟花；**C** 吊钟花；**D** 齿缘吊钟花；**E–F** 毛叶吊钟花；**G–H** 灯笼树。标尺为 2.5 μm。

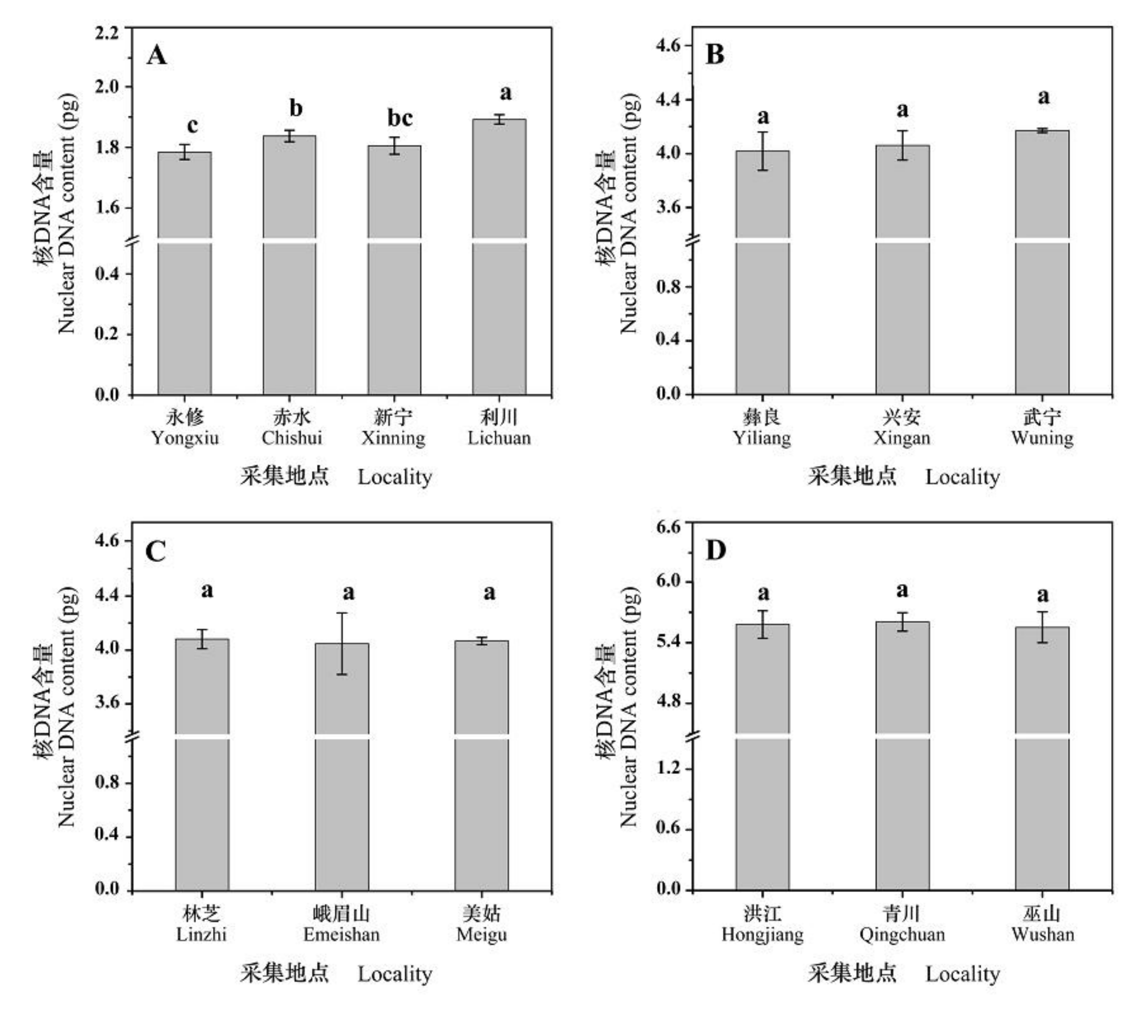
A *E. serotinus*; **B** *E. perulatus*; **C** *E. quinqueflorus*; **D** *E. serrulatus*; **E–F** *E. deflexus*; **G–H** *E. chinensis*. Bars=2.5 μm.

图 2　吊钟花属植物染色体压片镜检图

Fig. 2　Chromosomes of *Enkianthus* Lour examinated under microscope

2.3 吊钟花属种间与种内核 DNA 含量（2C-值）差异

将吊钟花属植物核 DNA 含量数据进行单因素方差分析，二倍体 4 个种的核 DNA 含量之间有显著差异（*P*<0.05），其中，吊钟花核 DNA 含量显著低于其他二倍体物种，台湾吊钟花核 DNA 含量显著高于其他二倍体物种。然而，相同倍性的灯笼树和毛叶吊钟花核 DNA 含量无显著差异（*P*>0.05）（表 2）。选取样本量较多的齿缘吊钟花、灯笼树和毛叶吊钟花，对其种内不同居群间的核 DNA 含量进行了单因素方差分析。发现二倍体齿缘吊钟花不同居群之间存在显著性差异（图 3）（*P*<0.05）。而多倍体物种灯笼树和毛叶吊钟花在相同倍性的情况下，不同居群之间的核 DNA 含量没有显著性差异（图 3）（*P*>0.05）。



A. 齿缘吊钟花；**B.** 灯笼树（4x）；**C.** 毛叶吊钟花（4x）；**D.** 灯笼树（6x）。不同小写字母表示差异显著（*P*<0.05）。

A. *E. serrulatus*; **B.** *E. chinensis* (4x); **C.** *E. deflexus* (4x); **D.** *E. chinensis* (6x). Different lowercase letters indicate significant difference at *P*<0.05.

图 3 吊钟花属种内不同居群核 DNA 含量

Fig. 3 Nuclear DNA content in intraspecific populations of *Enkianthus*

3 讨论与结论

[键入文字]

自然界中不同类群之间植物核 DNA 含量差异很大（Chen et al., 2010），杜鹃花科各类群之间核 DNA 含量亦是如此。根据植物 DNA C-值数据库的记录，目前，杜鹃花科已报道 12 属 25 种植物核 DNA 含量（2C-值），核 DNA 含量最小的是密花欧石南（*Erica multiflora*）为 0.96 pg（Pellicer et al., 2010），最大的是水晶兰（*Monotropa uniflora*）为 59.80 pg（Bai et al., 2012）。吊钟花属植物核 DNA 含量为 1.77–5.62 pg，属于杜鹃花科植物内核 DNA 含量偏小的类群。在同属相同倍性的植物间也存在显著差异，如越桔属（*Vaccinium*）（Costich et al., 1993）、枣属（*Ziziphus*）（吴丽萍等，2013）、草莓属（*Fragaria*）（陈丙义等，2015）等。本研究中四个二倍体植物间存在显著性差异，且吊钟花（*Enkianthus quinqueflorus*）和齿缘吊钟花（*E. serrulatus*）核 DNA 含量显著低于晚花吊钟花（*E. serotinus*）和台湾吊钟花（*E. perulatus*）（P<0.05）。核 DNA 含量差异大，说明物种间生态位分离大，生态适应性多样化（李国旗等，1999）。在同一科（或属）内相同生活型的相关物种间，核 DNA 含量越低，其生长发育速率越快，所要求的的世代时间变短，能适应条件恶劣的环境，所以其分布范围广（倪丽萍等，2005；郭水良等，2008）。查阅文献加上多年野外调查，我们发现吊钟花和齿缘吊钟花的确要比晚花吊钟花和台湾吊钟花的分布范围广（徐廷志，1982），说明吊钟花和齿缘吊钟花拥有更强的环境适应能力。对于分布范围较小且环境适应能力较弱的晚花吊钟花和台湾吊钟花可以考虑采用迁地保护，收集种子等策略保护这一稀缺植物资源。

一定程度上，同种植物为了保证遗传的稳定性，核 DNA 含量是保持恒定的，如木豆（*Cajanus cajan*）（Greilhuber & Obermayer, 1998）、小麦（*Triticum aestivum*）（Wetzel et al., 1999）、*Seleria albicans*（Lysák et al., 2000）等。本研究中多倍体植物灯笼树（*Enkianthus chinensis*）和毛叶吊钟花（*E. deflexus*）在相同倍性的情况下，种间、种内没有显著性差异（P>0.05），拥有较为稳定的遗传体系，没有随着物种、地理环境等因素的不同而产生较大差异。但是，在自然界中依旧存在不少例外，早在 1966 年，Evans 等（1966）发现不同环境下的亚麻（*Linum usitatissimum*）核 DNA 含量存在 16%的差异。在玉米（*Zea mays*）（Laurie & Bennett, 1985）、黑麦草（*Lolium perenne*）（Sugiyama et al., 2002）、葫芦（*Lagenaria siceraria*）（Achigan et al., 2008）等植物中也有类似报道，这些差异可能是不同环境的气候地理条件、生境、种群密度和生长发育阶段等因素导致的（郭水良等, 2011）。本研究二倍体齿缘吊钟花核 DNA 含量除了贵州赤水与湖南新宁的居群之间没有显著差异，其他居群之间存在显著性差异。比较这四个居群的气候地理条件可以发现，仅有贵州赤水与湖南新宁的居群分布环境属于典型的丹霞地貌，而丹霞地貌的土壤保水能力差，生长在该地域的植物有较强的抗旱能力（张贵志, 2012）。而江西永修的居群濒临鄱阳湖，鄱阳湖由于复杂的地形和水陆地表性质不均匀性，影响湖区的中小尺度对流天气系统的发生、发展和消亡，对植物生长的气候环境影响很大（傅敏宁, 2013）。至于湖北利川的居群，处于中亚热带与北亚热带的过渡地带，因山岭重叠，溪谷纵横，相对高差大，气候变化较大，山地气候明显。不同的地理环境条件对植物的生长发育影响极大，这可能也是齿缘吊钟花不同居群植物核 DNA 含量存在差异的原因。

我们基于流式细胞术，以二倍体齿缘吊钟花为倍性参照，推测出了吊钟花属其他 5 个种的倍性水平。有意思的是，灯笼树和毛叶吊钟花四倍体个体存在非整倍性问题，四倍体物种的核 DNA 含量约为二倍体齿缘吊钟花核 DNA 含量的 2.2 倍，台湾吊钟花的 2.0 倍。其原因可能是：（1） 倍性参照的选择，不同二倍体物种核 DNA 含量存在显著性差异，以不同二倍体种为参照，所推测目标种的核 DNA 含量比值也有差异（Wang et al, 2009）；（2）四倍体物种可能来源于核 DNA 含量较大的物种杂交（Yokoya et al., 2000）。所以，若研究吊钟花属四倍体物种起源进化时，应该重点关注二倍体物种中核 DNA 含量较大的台湾吊钟花和晚花吊钟花。除此之外，我们还发现吊钟花属六倍体植物的核 DNA 含量小于四倍体核 DNA 含量的 1.5 倍，小于二倍体晚花吊钟花和台湾吊钟花核 DNA 含量的 3 倍。Bonos 等（2002）

发现剪股颖属（*Agrostis*）六倍体植物核 DNA 含量小于二倍体核 DNA 含量的 3 倍，Jian 等（2014）也发现了在蔷薇属（*Rosa*）四倍体植物核 DNA 含量小于二倍体核 DNA 含量的 2 倍。这些差异可能是物种之间基因组本质差异，也可能是高倍性的植物加倍形成过程中舍弃一些重复的 DNA 片段导致的（Bonos et al., 2002）。

值得注意的是，吊钟花属吊钟花组除了分布在中国的四个物种为二倍体，还有分布在日本的 *Enkianthus perulatus* 也为二倍体（Sax, 1960），总状花序组的灯笼树和毛叶吊钟花均存在四倍体与六倍体，分布在日本的 *E. campanulatus* 为八倍体，该组暂未发现二倍体物种，说明该属这两个组在倍性水平上有较大区别。该属这两个组的划分不仅在宏观形态（徐廷志, 1982）、微观花粉（程子白和赖小荣, 1988）、分子标记（Tsutsumi & Hirayama, 2012）和化学成分（陈孝泉等, 1986）上得到支持，而如今在核 DNA 含量与物种倍性上也印证了以上划分的合理性。但是，关于吊钟花属核 DNA 含量与倍性水平研究还不完善，比如分布在中国的单花吊钟花（*E. pauciflorus*）以及分布在日本的 *E. sikokianus*，*E. cernuus*，*E. nudipes* 皆因材料获取困难而没有得到充分研究。除此之外，本研究中有三个物种的五个居群 E7、E8、E9、E12、E18 样品量较少，考虑到一个样品量较少的居群植物核 DNA 含量可能无法代表单个物种的核 DNA 含量，所以本研究采用了多个居群去衡量单个物种的核 DNA 含量，可以更好的反映单个物种的核 DNA 含量（Bai et al., 2012; Pellicer et al., 2012）。

吊钟花属植物染色体大小约为 1–2 µm，属于小染色体（Lima-De-Faria A, 1980），难以进行核型分析。该属植物流式细胞术倍性推测结果与染色体压片结果一致，说明流式细胞术检测结果可靠，可以用于该属植物大规模倍性测定，这将极大提高植物倍性检测的效率。本研究首次报道了吊钟花、齿缘吊钟花、晚花吊钟花、灯笼树、毛叶吊钟花共 5 个种的核 DNA 含量（2C-值）、基因组大小和倍性水平，以及台湾吊钟花的核 DNA 含量（2C-值）和基因组大小。吊钟花属内存在 2x、4x、6x、8x，甚至同一个物种内都存在多个倍性，由此可见，该属多倍化现象非常普遍。至于该属植物不同多倍体是如何形成的？不同倍性物种之间的系统发育关系如何？倍性变异在吊钟花属植物生态分化、物种形成中起到什么作用？这些有意义的问题尚未解决，但本研究为这些问题的解决奠定了重要的研究基础。

参考文献

ACHIGAN-DAKO EG, FUCHS J, AHANCHEDE A, et al., 2008. Flow cytometric analysis in *Lagenaria siceraria* (Cucurbitaceae) indicates correlation of genome size with usage types and growing elevation [J]. Plant Syst Evol, 276(1–2): 9–19.

ANDERBERG AA, 1994. Cladistic analysis of *Enkianthus* with notes on the early diversification of the Ericaceae [J]. Nord J Bot, 14(4): 385–401.

BAILEY JP, KAY QON, MCALLISTER H, et al., 2008. Chromosome numbers in *Sorbus* L. (Rosaceae) in the British Isles [J]. Watsonia, 27(1): 69–72.

BAI CK, ALVERSON WS, FOLLANSBEE A, et al., 2012. New reports of nuclear DNA content for 407 vascular plant taxa from the United States [J]. Ann Bot, 110(8): 1623–1629.

BEAULIEU JM, LEITCH IJ, KNIGHT CA, 2007. Genome size evolution in relation to leaf strategy and metabolic rates revisited [J]. Ann Bot, 99(3): 495–505.

BEAULIEU JM, LEITCH IJ, PATEL S, et al., 2008. Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms [J]. New Phytol, 179(4): 975–986.

BENNETT MD, BHANDOL P, LEITCH IJ, 2000. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses: 807 new estimates [J]. Ann Bot, 86: 859–909.

BENNETT MD, LEITCH IJ, 2011. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow [J]. Ann Bot, 107(3): 467–590.

BONOS SA, PLUMLEY KA, MEYER WA, 2002. Ploidy determination in *Agrostis* using flow cytometry and morphological traits [J]. Crop Sci, 42(1): 192-196.

BRITTEN RJ, KOHNE DE, 1968. Repeated sequences in DNA [J]. Science, 161(3841): 529–540.

CHEN BY, LI JF, HUO HZ, et al., 2015. Estimation of genome size in six wild strawberry species [J]. J Fruit Sci, 32(1): 51-56. [陈丙义，李金凤，霍恒志，等，2015．6 种野生草莓基因组大小估算 [J]．果树学报，32(1)：51-56.]

CHEN GQ, GUO SL, YIN LP, 2010. Applying DNA C-values to evaluate invasiveness of angiosperms: validity and limitation [J]. Biol Invasions, 12(5): 1335–1348.

CHENG XQ, SHAO H, WANG GX, et al., 1986. The chemotaxonomy of *Enkianthus* [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 6(3): 209-212. [陈孝泉，邵宏，王国祥，等，1986．吊钟花属的植物化学分类 [J]．西北植物学报，6(3)：209-212.]

CHENG ZB, LAI XR, 1988. Studies on the pollen morphology and evolution of the genus *Enkianthus* [J]. J Sichuan Univ (Nat Sci Ed), 25(2): 221-229. [程子白，赖小荣，1988．吊钟花属 *Enkianthus* 花粉形态及其演化关系的研究 [J]．四川大学学报（自然科学版），25(2)：221-229.]

COSTICH DE, ORTIZ R, MEAGHER TR, et al., 1993. Determination of ploidy level and nuclear DNA content in blueberry by flow cytometry [J]. Theor Appl Genet, 86(8): 1001–1006.

DEELEY EM, 1955. An integrating micodensitometer for biological cells [J]. J Sci Instrum, 32(7): 263–267.

DOLEŽEL J, BARTOŠ J, 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size [J]. Ann Bot, 95: 99–110.

DOLEŽEL J, BARTOŠ J, VOGLMAYR H, et al., 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human [J]. Cytom Part A, 51(2): 127–128.

DOLEŽEL J, GREILHUBER J, SUDA J, 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry [J]. Nat Protoc, 2(9): 2233–2244.

EVANS GM, DURRANT A, REES H, 1966. Associated nuclear changes in the induction of flax genotrophs. Nature, 212(5063): 697–699.

FANG RZ, STEVENS PF, 2005. *Enkianthus* [M]// WU ZY, RAVEN PH. Flora of China. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press: 243–245.

FEULGEN R, ROSSENBECK H, 1924. Mikroskopisch-chemischer nachweis einer nukleinsäure von typus der thymonucleinsäure und die darauf beruhende selektive färbung von zellkernen in mikroskopischen präparaten [J]. Hoppe-Seylers Z Physiol Chem, 135(5–6): 203–248.

FU MN, 2013. Research on the impacts of Poyang lake on typical weather process and the characteristics of near surface boundary layer, Jiangsu China [D]. Nanjing: Nanjing University of Information Science and Technology: 8–10. [傅敏宁，2013．鄱阳湖对典型天气过程的影响及近地面边界层特征研究 [D]．南京：南京信息工程大学：8-10.]

GALBRAITH DW, HARKINS KR, MADDOX JM, et al., 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues [J]. Science, 220(4601): 1049–1051.

GREILHUBER J, OBERMAYER R, 1998. Genome size variation in *Cajanus cajan* (Fabaceae): A reconsideration [J]. Plant Syst Evol, 212: 135–141.

GUO SL, CHEN GQ, MAO LH, 2008. Relationship between DNA C-value and invasiveness in 539 angiosperm species in China [J]. Acta Ecol Sin, 28(8): 3698-3705. [郭水良，陈国奇，毛俐

慧，2008．DNA C-值与被子植物入侵性关系的数据统计分析——以中国境内有分布的 539 种被子植物为例 [J]．生态学报，28(8)：3698-3705.]

GUO SL, ZHOU P, YIN LP, et al., 2011. Interspecific and intraspecific variations of plant DNA C-values and its biological significance [J]. J Shanghai Norm Univ (Nat Sci), 40(1): 102-110. [郭水良，周平，印丽萍，等，2011．植物 DNA C-值在种间和种内的变异及其生物学意义 [J]．上海师范大学学报（自然科学版），40(1)：102-110.]

JIAN H, ZHANG T, WANG Q, et al., 2014. Nuclear DNA content and 1Cx-value variations in genus *Rosa* L [J]. Caryologia, 67(4): 273–280.

KRON P, SUDA J, HUSBAND BC, 2007. Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology [J]. Annu Rev Ecol Evol Syst, 38(1): 847–876.

LAURIE DA, BENNETT MD, 1985. Nuclear DNA C-ontent in the genera *Zea* and *Sorghum*. Intergeneric, interspecific and intraspecific variation [J]. Heredity, 55: 307–313.

LI C, LU T, LIU Y, et al., 2020. Effects of different treatments on seed germination of *Enkianthus chinensis* Franch [J]. N Hortic, 469(22): 72-78. [李超，卢婷，刘阳，等，2020．不同处理对灯笼树种子萌发的影响 [J]．北方园艺，469(22)：72-78.]

LI GQ, AN SQ, CHEN XL, et al., 1999. A primary research onrelationship peteen C value paradox and its ecological adaptation of the life [J]. Explor Nat, 18(2): 1-66. [李国旗，安树青，陈兴龙，等，1999．生物的 C 值矛盾与其生态适应性的关系初探 [J]．大自然探索，18(2)：61-66.]

LIMA-DE-FARIA A, 1980. Classification of genes, rearrangements and chromosomes according to the chromosome field [J]. Hereditas, 93(1): 1–46.

LYSÁK MA, ALEXANDRA R, DIXON JM, et al., 2000. Limited genome size variation in *Sesleria albicans* [J]. Ann Bot, 86(2): 399–403.

NI LP, GUO SL, 2005. Review on relationship between invasiveness of plants and their DNA C-value [J]. Acta Ecol Sin, 25(9): 372-2381. [倪丽萍，郭水良，2005．论 DNA C-值与植物入侵性的关系 [J]．生态学报，25(9)：2372-2381.]

OGAWA M, HISADA S, INAGAKI I, 1970. Studies on the constituents of *Enkianthus nudipes*. I. New flavan glucosides of the leaves and its absolute configuration [J]. Yakugaku Zasshi, 90(9): 1081–1087.

PAN W, ZHU BZ, Xu B, et al., 2010. Nursery and twig-coiling techniques for raising seedlings of wild ornamental plants *Enkianthus quinqueflorus* Lour. [J]. Guangdong For Sci Technol, 26(6): 86-88. [潘文，朱报著，徐斌，等，2010．野生观赏花卉吊钟花实生和圈枝育苗技术 [J]．广东林业科技，26(6)：86-88.]

PELLICER J, CLERMONT S, HOUSTON L, et al., 2012. Cytotype diversity in the *Sorbus* complex (Rosaceae) in Britain: sorting out the puzzle [J]. Ann Bot, 110(6): 1185–1193.

PELLICER J, ESTIARTE M, GARCIA S, et al., 2010. Genome size unaffected by moderate changes in climate and phosphorus availability in Mediterranean plants [J]. Afr J Biotechnol, 9(37): 6070–6077.

SAKAKIBARA J, KAIYA T, FUKUDA H, et al., 1983. 6β-Hydroxyursolic acid and other triterpenoids of *Enkianthus cernuus* [J]. Phytochemistry, 22(11): 2553–2555.

SASAKI T, BURR B, 2000. International rice genome sequencing project: The effort to completely sequence the rice genome [J]. Curr Opin Plant Biol, 3(2): 138–141.

SAX HJ, 1960. Polyploidy in *Enkianthus* (Ericaceae) [J]. J Arnold Arbor, 41(2): 191–196.

SCHMIDT G, THANNHAUSER SJ, 1945. A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues [J]. J Biol Chem, 161(161): 83–89.

SUGIYAMA S, YAMAGUCHI K, YAMADA T, 2002. Intraspecific phenotypic variation associated with nuclear DNA content in *Lolium perenne* L [J]. Euphytica, 128(2): 145–151.

SWIFT H, 1950. The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei [J]. P Natl Acad Sci USA, 36(11): 643–654.

TSUTSUMI C, HIRAYAMA Y, 2012. The phylogeny of Japanese *Enkianthus* species (Ericaceae) [J]. Bull Natl Mus Nat Sci, Ser. B, 38(1) : 11–17.

VILHAR B, GREILHUBER J, KOCE JD, et al., 2001. Plant genome size measurement with DNA image cytometry [J]. Ann Bot, 87: 719–728.

WANG HQ, MA SG, LIN MB et al., 2020. Hydroxylated ethacrylic and tiglic acid derivatives from the stems and branches of *Enkianthus chinensis* and their potential anti-inflammatory activities [J]. J Nat Prod, 83(10): 2867–2876.

WANG X, JIANG R, LIU Z, et al., 2014. Phytochemicals and biological activities of poisonous genera of Ericaceae in China [J]. Nat Prod Commun, 9(3): 427–442.

WANG Y, BIGELOW CA, JIANG Y, 2009. Ploidy level and DNA content of perennial ryegrass germplasm as determined by flow cytometry [J]. Hortscience, 44(7): 2049–2052.

WETZEL JB, AREF S, BALIGAR VC, et al., 1999. A lack of nuclear DNA C-ontent variability among wheat near isolines differing in aluminium response [J]. Ann Bot, 83(6): 725–728.

WU LP, TANG Y, LI YY, et al., 2013. Estimation of genome size of *Ziziphus jujuba* and *Z. acdiojujuba* [J]. J Beijing For Univ, 35(3): 77–83. [吴丽萍，唐岩，李颖岳，等，2013．枣和酸枣基因组大小测定 [J]．北京林业大学学报，35(3)：77–83.]

XU TZ, 1982. Classification, distribution and phylogeny of the genus *Enkianthus* [J]. Acta Bot Yunnan, 4(4): 355-362. [徐廷志，1982．吊钟花属的分类、地理分布和系统发育 [J]．云南植物研究，4(4)：355-362.]

YANG JF, LIU XY，ZHANG SZ, et al., 2009. Tissue culture of *Enkianthus quinqueflorus* Lour. [J]. J Trop Subtrop Bot, 17(4): 383-387. [杨建芬，刘兴尧，张寿洲，等，2009．吊钟花的组织培养技术研究 [J]．热带亚热带植物学报，17(4)：383-387.]

YE LJ, ZHANG ZR, SUN ZX, et al., 2015. The determination of nuclear DNA content(2C-value) on some representative genus and species of Magnoliaceae [J]. Plant Divers Res, 37(5): 605-610. [叶林江，张志荣，孙志霞，等，2015．木兰科主要属种核 DNA 含量(2C-值)的检测 [J]．植物分类与资源学报，37(5)：605-610.]

YOKOYA K, ROBERTS AV, MOTTLEY J, et al., 2000. Nuclear DNA amount in *Roses* [J]. Ann Bot, 85(4):557–561.

ZHANG GZ, 2012. Study on plants of danxia landform in Hunan and Jiangxi, Hunan, China [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology: 32-34. [张贵志，2012．湘赣典型丹霞地貌植物研究 [D]．长沙：中南林业科技大学：32-34.]